




Biodegradable collagen containing hydrophilic polymer**Publication number:** FR2759083 (A1)**Publication date:** 1998-08-07**Inventor(s):** TAYOT JEAN LOUIS; TARDY MICHEL; GRAVAGNA PHILIPPE**Applicant(s):** DEV DES UTILISATIONS DU COLLAG [FR]**Classification:****- International:** A61L31/04; A61L31/14; A61L31/04; A61L31/14; (IPC1-7): C07K14/78; A61L15/00; A61L25/00; A61L31/00**- European:** A61L31/04B; A61L31/14K**Application number:** FR19970001373 19970206**Priority number(s):** FR19970001373 19970206**Also published as:** FR2759083 (B1)**Cited documents:** EP0664132 (A1) WO9608277 (A1) EP0213563 (A2)**Abstract of FR 2759083 (A1)**

A biocompatible collagenic material that is non-toxic, potentially adhesive, and biodegrades within a week comprises a crosslinked collagen, and a macromolecular hydrophilic additive, chemically inactive towards the collagen.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : 2 759 083

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : 97 01373

⑤① Int Cl⁶ : C 07 K 14/78, A 61 L 25/00, 31/00, 15/00

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 06.02.97.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 07.08.98 Bulletin 98/32.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : SOCIETE ANONYME DE DEVELOP-
PEMENT DES UTILISATIONS DU COLLAGENE
S.A.D.U.C SOCIETE ANONYME — FR.

⑦② Inventeur(s) : TAYOT JEAN LOUIS, TARDY MICHEL
et GRAVAGNA PHILIPPE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ MATERIAU COLLAGENIQUE UTILE NOTAMMENT POUR LA PREVENTION D'ADHERENCES POST-
OPERATOIRES.

⑤⑦ La présente invention concerne un matériau colla-
génique biocompatible, non toxique, potentiellement adhésif
et biodégradable en moins d'une semaine. Celui-ci com-
prend du collagène et au moins un additif hydrophile macro-
moléculaire, chimiquement non réactif vis-à-vis du
collagène, le collagène étant réticulé.

L'invention concerne également un procédé pour l'ob-
tention d'un tel matériau.

Le matériau collagénique selon l'invention trouve une
application particulière dans la prévention des adhérences
post-opératoires.

FR 2 759 083 - A1



La présente invention concerne un matériau collagénique
5 biocompatible, non toxique, potentiellement adhérent et rapidement
biodégradable. Elle concerne plus particulièrement un matériau
collagénique capable d'inhiber la formation d'adhérences post-
opératoires.

L'invention est également relative à un procédé d'obtention
10 d'un tel matériau.

Les adhérences post-opératoires se développent après
intervention chirurgicale chez un patient dont certains organes ont
subi un traumatisme engendré par l'acte chirurgical lui-même.

Les plaies créées par dissection d'organes et de tissus, ou toute
15 autre intervention se caractérisent par deux phénomènes :

- ces plaies ne sont pas étanches et laissent exsuder
spontanément un liquide plasmatique contenant de la fibrine,
quelquefois même du sang si l'hémostase n'a pu être achevée de
manière parfaite ; certains organes laissent suinter d'autres liquides
20 comme la bile du foie ou le liquide cérébro-spinal au niveau du
système nerveux.

- les surfaces lésées ne possèdent plus de barrière tissulaire
organisée et stable et quelquefois même sont parsemées de corps
étrangers : fils de sutures, agrafes, caillots, agents infectieux, tissus
25 brûlés par les bistouris électriques ou faisceaux lasers.

Ces deux caractéristiques entraînent une réaction de
l'organisme commençant par l'inflammation et se poursuivant par une

migration et une prolifération cellulaires intenses, généralement mal organisées. Celles-ci créent le plus souvent des tissus néoformés, fibreux, vascularisés, reliant les organes lésés aux organes voisins.

De nombreuses revues ont été publiées sur le sujet (voir en particulier DI ZEREGA (1994)).

Diverses solutions ont déjà été proposées, notamment sur le plan pharmacologique, avec plus ou moins de succès.

La solution la plus efficace que l'on connaisse à ce jour est de poser sur la plaie une barrière physique, isolant les organes les uns des autres et leur permettant de cicatriser de manière indépendante sans développer d'interrelations.

Les barrières physiques qui conduisent aux meilleurs résultats sont constituées de tissus artificiels, non dégradables, sur lesquels les cellules ne s'attachent pas. Le Téflon ® et le silicone sont parmi les polymères les plus efficaces.

L'inconvénient majeur est qu'il faut retirer ces barrières physiques plusieurs semaines plus tard, par une seconde opération chirurgicale qui peut, en outre, créer elle-même d'autres adhérences secondaires au niveau de la laparotomie.

Il est donc indispensable de développer des barrières biodégradables qui évitent une seconde intervention.

Dans cet objectif, de nombreux polymères naturels biodégradables ont déjà été proposés, à partir de gélatine, de collagène, de polysaccharides, de mucopolysaccharides, etc. mais ceux-ci n'ont pas conduit à des résultats satisfaisants.

Selon l'équipe de RODEHEAVER (HARRIS et Coll., 1995) l'objectif minimum est que la barrière demeure présente au moins

pendant 36 heures. Ceci s'explique en raison du fait qu'un temps minimum est nécessaire pour permettre les mécanismes complexes de cicatrisation.

Cependant, le temps de résorption ne doit pas être trop long. Si
5 le matériau demeure plus d'une semaine au contact de la plaie, il peut entraîner des réactions inflammatoires persistantes qui favorisent une réaction fibreuse inorganisée et plus importante, et qui peuvent causer localement des problèmes anatomiques : épaisseur, rigidité, rétrécissement, ischémie, granulome ou un foyer persistant d'infection
10 surtout en contact avec les intestins et les organes digestifs.

En outre, il apparaît que le matériau devant servir de barrière physique devrait adhérer correctement aux tissus lésés, surtout pour la protection d'organes mobiles ou soumis à des distensions variables comme l'intestin, ou plus simplement pour éviter de migrer en réponse
15 aux mouvements du patient et aux contraintes mécaniques que ceux-ci entraînent.

La difficulté d'obtenir toutes ces propriétés réunies dans un même biomatériau explique pourquoi les solutions et produits proposés à ce jour se révèlent encore très insuffisants.

20 Les produits biodégradables aujourd'hui commercialisés pour la prévention d'adhérences ne sont que partiellement actifs et donnent des résultats encore insuffisants.

Les dérivés de cellulose commercialisés par Johnson & Johnson Medical (Arlington, Texas, Etats-Unis), comme les produits
25 SURGICELL ® ou INTERCEED ®, ne peuvent être utilisés en présence de sang et montrent, dans certains modèles animaux, des résultats

décevants (HARRIS et Coll., 1995) ; d'autre part, ils se dégradent en plus de deux semaines.

Le produit SEPRAFILM[®], commercialisé par Genzyme, (Cambridge, Massachusetts, Etats-Unis), est un film d'acide hyaluronique et de carboxyméthylcellulose qui ne semble efficace que dans la moitié des cas (BECKER et Coll., 1996). Il se dégrade très rapidement en quelques jours, mais est difficile à manipuler. Il est fragile, cassant et impossible à utiliser à travers un trocart en laparoscopie. Enfin, il n'est pas suffisamment adhérent et peut migrer à distance, laissant la plaie non protégée.

Parmi les produits récemment décrits par les chercheurs dans la littérature ou les demandes de brevet publiées, il apparaît que de nombreux problèmes restent encore non solutionnés.

Parmi ceux-ci, divers matériaux collagéniques ont été proposés.

KHOURY et Coll. (1994), pour la société COLETICA (Lyon, France), proposent une membrane de collagène constituée de deux couches, l'une à base de collagène natif, formant support et recouverte d'une seconde couche de gélatine. La conception de cette membrane s'inspire d'un patch de chirurgie viscérale développé par TAYOT et Coll. (1988). Ce matériau a une durée de dégradation très largement supérieure à 1 semaine et ne possède donc pas la propriété essentielle qui est de disparaître en moins de 7 jours. Mais il présente surtout l'inconvénient de ne pas être suffisamment adhérent et en conséquence, de nécessiter des points de suture pour son application, qui peuvent engendrer des complications indésirables.

ORLY I. en 1994, pour la société COLETICA, a proposé une membrane transparente de collagène, constituée d'une seule couche

ou de deux couches selon les exemples, et le plus souvent associée à une prothèse non dégradable, pour le traitement des hernies ou des éventrations. Cette membrane doit être agrafée ou suturée ; elle n'est donc pas suffisamment adhérente pour être utilisée sans artifices.

5 Pour faciliter l'agrafage, la transparence de la membrane est nécessaire pour éviter de blesser des zones sensibles (nerfs, vaisseaux) comme dans les hernies inguinales. Les risques associés à l'agrafage de prothèses herniaires en particulier, sont bien connus. Pour cette raison, les chirurgiens seraient davantage intéressés par le
10 collage de ces prothèses, évitant ainsi toutes sutures ou agrafes. ORLY I. précise, de manière surprenante, que cette membrane ne doit pas être adhésive, car la membrane développée par KHOURY et Coll. dans la même société COLETICA (citée ci-dessus) ne peut être utilisée dans cette indication, en raison de ses propriétés adhésives qui ne
15 facilitent pas l'introduction en coeliochirurgie. Le délai de résorption de cette membrane est très largement supérieur à 1 semaine puisque, à 5 semaines, la résorption n'est pas complète et qu'il faut attendre 3 mois pour l'élimination totale du matériau. Malgré ces délais, très longs, le déposant affirme de manière paradoxale l'avantage d'un
20 temps de résorption « relativement » rapide.

YEUNG et Coll., pour la société Collagen Corporation (Palo Alto, Californie, Etats-Unis) proposent, en 1995, de lier à un substrat collagénique, un agent anti-adhérences dérivé du polyéthylène glycol par liaisons covalentes. Ce produit est très complexe à réaliser et
25 demande l'utilisation de dérivés du polyéthylène glycol difficiles à fabriquer, coûteux et non dénués de risques toxiques associés à leur réactivité chimique. Enfin, le temps de résorption de ce matériau

constitué de collagène dense est, lui aussi, très supérieur à 1 semaine, puisque le temps de résorption minimum cité est de 10 jours et le plus souvent de 30 à 50 jours.

TARDY et Coll., en 1994 dans un brevet pour la société
5 IMEDEX, maintenant dénommée SADUC, proposent une colle biologique liquide dérivée du collagène, qui a des propriétés anti-adhérentes. Les avantages de ce produit sont notamment son adhérence et sa dégradation rapide en quelques jours. Les propriétés adhésives viennent de la réticulation des molécules de collagène
10 oxydé à l'acide périodique et conservé liquide à pH acide. Cette réticulation est déclenchée par addition d'une solution alcaline, ou tampon, qui neutralise le pH et transforme rapidement la solution de collagène oxydé en un solide adhérent. L'efficacité de ce produit dans la prévention d'adhérences post-opératoires, démontrée dans
15 plusieurs modèles animaux, n'est cependant pas facilement exploitable en pratique. En effet, ce produit nécessite un stockage permanent sous forme congelée, difficile à réaliser dans les circuits hospitaliers courants.

Divers biomatériaux collagéniques obtenus par réticulation du
20 collagène après oxydation par l'acide périodique ont été également décrits dans un brevet par M. TARDY et Coll., en 1986. Des films de collagène oxydé réticulé ont été préparés par séchage sous flux d'air stérile de solutions de collagène oxydé additionné de glycérine. Ces films ont des propriétés qui sont fonction de la quantité de glycérine
25 utilisée. Pour obtenir des films souples, non cassants, présentant une résistance acceptable, il faut employer une quantité de glycérine suffisante, environ égale en poids à la quantité de collagène.

Cependant, dans ces conditions, ils collent à leur support, aux gants et aux instruments du chirurgien, manquent de rigidité à cause de leur finesse et sont très difficiles d'emploi s'ils ne sont pas associés à un autre matériau.

5 L'invention décrite ci-après permet de résoudre les inconvénients cités précédemment.

Elle a en particulier pour objectif de fournir un matériau biocompatible, non toxique et non collant au toucher à l'état sec pour la facilité de manipulation mais pouvant développer des propriétés
10 adhérentes en milieu aqueux, en particulier en milieu physiologique.

L'invention a encore pour objectif de fournir un matériau biodégradable rapidement, à savoir en moins d'une semaine.

L'invention a également pour objectif de fournir un matériau collagénique adapté à une utilisation comme barrière anti-adhérences
15 post-opératoire.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un procédé pour l'obtention d'un tel matériau.

A cette fin, l'invention a pour objet un matériau collagénique biocompatible, non toxique, potentiellement adhésif et biodégradable
20 en moins d'une semaine, caractérisé en ce qu'il comprend du collagène et au moins un additif hydrophile macromoléculaire, chimiquement non réactif vis-à-vis du collagène, le collagène étant réticulé.

L'invention a également pour objet un procédé pour l'obtention
25 d'un matériau collagénique biocompatible, non toxique, potentiellement adhérent et biodégradable en moins d'une semaine, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la préparation d'une solution de collagène modifié par coupure oxydative ;
- b) le traitement par chauffage à une température supérieure à 37°C, de ladite solution ;
- 5 c) le mélange de la solution collagénique résultante avec une solution contenant au moins un additif hydrophile macromoléculaire, chimiquement non réactif vis-à-vis du collagène présent ;
- d) la neutralisation dudit mélange jusqu'à pH neutre.

10 Les inventeurs ont découvert, de manière surprenante, qu'un mélange de collagène réticulé et d'un additif hydrophile macromoléculaire, pouvait constituer un matériau biocompatible et non toxique à la fois non collant au toucher à l'état sec, adhérent en milieu aqueux (physiologique) et biodégradable en quelques jours.

15 Ils ont mis en évidence que l'on pouvait obtenir un tel matériau en réticulant du collagène préalablement modifié par coupure oxydative et chauffage, en présence d'un additif hydrophile macromoléculaire, chimiquement non réactif vis-à-vis du collagène.

Ils ont découvert en particulier que la présence de l'additif
20 hydrophile permettait, de manière inattendue, d'augmenter la densité et la résistance mécanique du collagène, de permettre une adhérence satisfaisante, notamment en milieu physiologique, à des organes et de favoriser sa dégradation, qui peut ainsi être ramenée à quelques jours.

25 On décrit ci-après le procédé de préparation d'un matériau collagénique selon la présente invention.

Le collagène mis en œuvre pour l'obtention d'un matériau collagénique tel que défini précédemment, peut être indifféremment d'origine animale ou humaine. On utilise de préférence du collagène natif, solubilisé à pH acide ou après traitement par digestion à la pepsine. Il peut s'agir en particulier du collagène bovin de type I ou de collagènes humains de type I ou III ou encore de mélanges en toutes proportions de ces derniers.

Le collagène est modifié par coupure oxydative. On peut utiliser à cet effet de l'acide périodique ou l'un de ses sels selon la technique décrite par M. TARDY et Coll. (1986).

On rappelle brièvement que cette technique consiste à soumettre une solution acide de collagène à l'action de l'acide périodique ou l'un de ses sels par mélange avec une solution de cet acide ou sel à une concentration comprise entre 1 et 10^{-5} M, de préférence entre $5 \cdot 10^{-3}$ M et 10^{-1} M, à une température voisine de la température ambiante, pendant une durée pouvant aller de 10 minutes à 72 heures.

Selon l'invention, on utilise une solution acide de collagène dont la concentration est comprise entre 5 et 50 g/l. La concentration en collagène est de préférence 30 g/l.

Ce traitement provoque des coupures dans certains constituants du collagène qui sont l'hydroxyproline et les sucres, et crée ainsi des sites réactifs sans en provoquer la réticulation.

Le collagène oxydé ainsi préparé en solution, est chauffé à une température supérieure à 37°C , de préférence à une température comprise entre 40 et 50°C .

On réalise ensuite la réticulation du collagène en présence d'au moins un additif hydrophile macromoléculaire, chimiquement non réactif vis-à-vis du collagène.

Par « chimiquement non réactif vis-à-vis du collagène », on entend un composé hydrophile qui n'est pas susceptible de réagir avec le collagène présent, notamment qui ne forme pas de liaison covalente avec celui-ci lors de sa réticulation.

L'additif hydrophile macromoléculaire selon l'invention présente un poids moléculaire avantageusement supérieur à 3 000 daltons.

Il peut s'agir de polymères hydrophiles de synthèse, avantageusement de poids moléculaire compris entre 3 000 et 20 000 Daltons. Le polyéthylèneglycol est particulièrement préféré.

Il peut s'agir également de polysaccharides, parmi lesquels on peut citer l'amidon, le dextrane et la cellulose qui sont préférés.

On peut également prévoir l'utilisation de tels polysaccharides sous forme oxydée faisant apparaître des fonctions carboxyliques dans ces molécules.

Les mucopolysaccharides peuvent également convenir aux fins de l'invention mais ne sont pas préférés car leur origine animale particulière les rend difficiles à préparer en satisfaisant aux normes réglementaires de traçabilité.

L'additif hydrophile est sélectionné en fonction de divers paramètres liés notamment à son application, comme son prix, son innocuité, sa biodégradabilité et/ou sa facilité d'élimination, notamment par voie rénale, en cas d'application thérapeutique.

Ladite réticulation est réalisée en mélangeant, à pH neutre, une solution de collagène modifié par coupure oxydative et chauffage

comme indiqué ci-dessus, avec une solution contenant au moins un additif hydrophile macromoléculaire.

La concentration en additif(s) hydrophile(s) est de 2 à 10 fois inférieure à celle du collagène.

5 La réticulation du collagène en présence de l'additif hydrophile est réalisée à une température comprise entre 4 et 30° C, de préférence 18 à 25° C.

 Selon une variante de mise en oeuvre, on prévoit d'effectuer la réticulation en présence de glycérine qui peut être ajoutée au mélange
10 collagène/additif hydrophile. Dans ce cas, la concentration en glycérine est avantageusement comprise entre 3 et 8 g/l, ne dépassant pas le tiers de la concentration du collagène.

 La polymérisation s'effectue pendant le séchage du matériau.

 Selon l'invention, on pense, sans que cela puisse être considéré
15 comme limitatif, que l'additif hydrophile qui est présent lors de la réticulation du collagène, est contenu dans le réseau collagénique formé, bien qu'il ne réagisse pas lui-même avec le collagène.

 Selon les applications envisagées, le matériau collagénique réticulé peut être soumis à divers traitements classiques tels que
20 séchage, stérilisation, etc ...

 Le collagène réticulé peut être séché notamment dans un flux d'air stérile, si nécessaire.

 La stérilisation est avantageusement opérée par irradiation avec des rayonnements bêta (irradiation électronique) ou gamma (irradiation
25 par le cobalt radioactif).

 Conformément à l'invention, le matériau collagénique peut être préparé sous la forme d'un film, gel ou pâte.

Selon les applications envisagées, on prévoit avantageusement le matériau collagénique sous la forme d'un film.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la solution contenant le collagène, ayant été préalablement modifiée par
5 coupure oxydative et par chauffage, un additif hydrophile macromoléculaire, et éventuellement de la glycérine, est répartie uniformément sur un support inerte sensiblement plan, pour former un film réticulé.

Le support est inerte en ce qu'il ne réagit pas avec les
10 composés précités et n'intervient pas dans le processus de réticulation. On peut utiliser un support hydrophobe de type PVC ou polystyrène.

Dans ce cas, on applique sur le support une solution dans laquelle les concentrations en collagène, en additif hydrophile et en
15 glycérine, si elle est présente, sont de préférence, respectivement comprises entre 2 et 6 % pour le collagène, 0,6 et 2 % pour l'additif hydrophile, 0,3 et 0,8 % pour la glycérine.

La couche mince appliquée présente avantageusement une densité allant de 0,05 à 0,3 g/cm².

20 Après réaction, le film est séparé du support.

Le matériau collagénique selon l'invention contient du collagène et au moins un additif hydrophile macromoléculaire selon un rapport collagène/additif(s) hydrophile(s) de 1/1 à 9/1, de préférence de 2/1 à 4/1 et plus préférentiellement encore de 3/1.

25 Il est stable à température ambiante, et reste stable pendant un temps suffisant pour sa manipulation, en milieu aqueux à des températures allant jusqu'à 37 à 40° C.

Le matériau collagénique selon l'invention est utile pour la prévention des adhérences post-opératoires.

Il peut être préparé sous forme « prête à l'emploi » comme par exemple par découpage aux dimensions appropriées à l'application envisagée, d'un film tel que décrit ci-dessus et conditionnement dans des conditions stériles.

Lorsqu'il est préparé sous forme de film, il est particulièrement adapté à cette application, notamment pour simplifier et accélérer le geste chirurgical.

En effet, le film collagénique obtenu est de manipulation aisée car il ne colle pas au toucher à l'état sec et il ne colle pas aux instruments.

Il présente par ailleurs une densité et une résistance mécanique accrues tout en étant relativement souple comme nécessaire.

La glycérine permet d'améliorer la souplesse du matériau final obtenu, et peut ainsi en faciliter l'utilisation.

Le matériau collagénique selon l'invention est capable de développer, en milieu aqueux, des propriétés d'adhésion.

Après implantation chez un patient, il peut adhérer de manière suffisante sur l'organe à protéger ce qui lui permet de tenir en place et est de ce fait adapté à une utilisation comme barrière anti-adhérences post-opératoire. En effet, au contact des tissus, un appel d'eau tissulaire entraîne une adhésion immédiate du film collagénique. L'appel d'eau gonfle progressivement le film de collagène dont la réticulation est assez peu dense pour permettre une certaine mobilité et souplesse des chaînes le constituant.

Il se forme ainsi en quelques minutes à quelques heures, un gel de collagène oxydé, réticulé et très hydraté grâce à l'additif hydrophile emprisonné dans les mailles du gel.

5 Ce gel acquiert des propriétés adhésives suffisantes pour établir une adhésion stable du biomatériau sur la plaie à protéger.

En outre, l'additif hydrophile macromoléculaire disparaît par diffusion à travers le matériau collagénique oxydé et réticulé, en quelques jours, matériau dont le gonflement favorise la dégradation en moins de 7 jours, le plus souvent en 2 à 3 jours.

10 L'invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples donnés ci-après à titre illustratif et non limitatif.

EXEMPLES

Exemple 1 :

Préparation d'un précipité acide de collagène modifié par coupure oxydative à l'aide d'acide périodique et non réticulé.

5 Cet exemple est directement réalisé à partir du brevet précédemment cité de TARDY et Coll. (1994).

Le collagène utilisé est du collagène bovin de type I, extrait de derme de veau par solubilisation à pH acide ou par digestion à la pepsine et purifié par précipitations salines selon des techniques déjà
10 décrites.

Les produits commercialisés par la société COLLAGEN Corp., sous les noms de VITROGEN ® ou ZYDERM ®, peuvent convenir dans cette application.

On utilise de préférence des fibres sèches de collagène, obtenues par précipitation d'une solution acide de collagène par
15 addition de NaCl, puis lavages et séchage du précipité obtenu par des solutions aqueuses d'acétone de concentration croissante de 80 % à 100 %.

On peut, de la même manière, utiliser des collagènes humains
20 de type I ou III ou leur mélange en toutes proportions.

Une solution de collagène à 30 g/l est préparée par dissolution en HCl 0,01 N. Son volume est de 49 litres. Elle est additionnée d'acide périodique à une concentration finale de 8 mM soit 1,83 g/l.

On réalise l'oxydation à température ambiante voisine de 22°C,
25 pendant 3 heures à l'abri de la lumière.

Puis, la solution est additionnée d'un volume égal d'une solution de chlorure de sodium pour obtenir une concentration finale de 41 g/l NaCl.

5 Après 30 minutes d'attente, le précipité est récolté par décantation à travers un tamis de toile de porosité voisine de 100 microns, puis lavé 4 fois avec une solution de NaCl 41 g/l en HCl 0,01 N. On obtient 19 kg de précipité salin acide. Ces lavages permettent l'élimination de toutes traces d'acide périodique ou dérivés iodés formés pendant l'oxydation du collagène.

10 Ensuite, plusieurs lavages en solution aqueuse d'acétone à 80 % permettent la concentration du précipité de collagène et l'élimination des sels présents.

Un lavage final en acétone 100 % permet de préparer 3,6 kg d'un précipité acétonique très dense, de collagène oxydé acide, non
15 réticulé, ne contenant aucune autre trace de produit chimique indésirable.

Exemple 2 :

**Préparation de films collagéniques anti-adhérences post-opératoires
20 selon l'invention.**

La pâte acétonique préparée selon l'exemple 1 est reprise en eau distillée apyrogène à 40°C, pour obtenir une concentration de collagène de 3 %.

25 La solution de 44 litres est chauffée 30 minutes à 50°C, puis filtrée stérilement sur membrane de porosité 0,45 microns dans une étuve à 40°C.

Cette solution est additionnée à 30°C d'une solution stérile concentrée de PEG 6 000 (polyéthylène-glycol de poids moléculaire 6 000 Daltons) pour atteindre une concentration de 1 % en PEG, puis de glycérine pour atteindre une concentration de 0,6 % en glycérine.

5 Le pH de la solution est ajusté à 7,0 par addition d'une solution concentrée de soude NaOH.

La solution est ensuite ajustée en volume par de l'eau stérile pour atteindre une concentration finale de 2,7 % de collagène, 0,9 % PEG et 0,54 % de glycérine, puis répartie en couche mince à une
10 densité de 0,133 g/cm² sur un support plan hydrophobe de type PVC ou polystyrène. Les surfaces sont ensuite soumises à un flux d'air stérile à température ambiante, qui conduit à l'évaporation en 18 heures environ.

Le film obtenu se décolle très facilement du support. Il peut être
15 découpé facilement aux dimensions souhaitées pour l'expérimentation.

Chaque film est conditionné individuellement en sachet primaire perméable à la vapeur, puis incubé 12 heures dans une étuve à 37°C dont le taux d'humidité relative est supérieur à 80 %.

20 Ensuite, le sachet précédent est inclus dans un conditionnement secondaire non perméable à l'air.

L'ensemble est stérilisé par irradiation bêta et reçoit une dose supérieure ou égale à 25 kilogreys.

En général, le film séché contient encore de l'eau résiduelle
25 jusqu'à une concentration pouvant atteindre 20 %.

Une composition typique dans l'exemple considéré est de 60 % en poids de collagène, 20 % en poids de PEG, 12 % en poids de glycérine et 8 % en poids d'eau.

Le film obtenu est stable à température ambiante. Il reste stable et facilement manipulable après 2 heures d'incubation en eau à 37°C.

La présence de glycérine dans le matériau n'est pas indispensable ; elle améliore la souplesse du film et en facilite l'utilisation.

Cet exemple peut être réalisé en remplaçant le PEG 6 000 par de l'amidon soluble (catalogue OSI France, référence A2620) ou par du Dextran T40 (catalogue PHARMACIA Fine Chemicals, Uppsala, Suède) ou par de la carboxymethylcellulose. Les concentrations utilisées et le mode opératoire sont identiques.

ETUDE DES PROPRIETES DU FILM COLLAGENIQUE SELON L'INVENTION DANS LA PREVENTION DES ADHERENCES POST-OPERATOIRES.

• Toxicologie

Le film collagène-PEG réalisé selon l'exemple 2 (ou un broyat de ce film) donne des résultats satisfaisants dans les tests toxicologiques standardisés auxquels sont soumis les biomatériaux pour implantation :

- absence de caractère mutagène dans le test d'AMES
- réaction normale, modérée dans le test d'hypersensibilité retardée sur cobaye (réaction de classe III)
- absence de toxicité systémique par voie intraveineuse ou intrapéritonéale chez la souris et le rat

- dégradation :

- . en moins de 7 jours par voie sous cutanée chez le rat
- . en 2 à 3 jours par voie intrapéritonéale chez le rat.

5

- Propriétés anti-adhérences post-opératoires

Les propriétés anti-adhérences post-opératoires ont été analysées selon le protocole décrit en référence par HARRIS et Coll. (1995).

10

Le protocole décrit dans cette publication a été mis en oeuvre sur des groupes de 10 rats.

Les essais consistent à créer une abrasion et une déshydratation sur des surfaces de 2 cm² de paroi péritonéale et de caecum, au contact l'une de l'autre.

15

Le groupe de rat témoins ne reçoit aucun produit de protection des plaies ainsi créées. Il est comparé au groupe de rats qui reçoit un film collagène-PEG selon l'exemple 2, recouvrant complètement les plaies, en débordant de 5 mm sur les parties externes non abrasées.

Après 7 jours d'attente, conformément au protocole publié, les résultats sont nets :

20

- Aucune adhérence n'est observée entre les deux surfaces lésées, dans le groupe de rats traités par le film de l'invention et la cicatrisation de chaque plaie initiale est complète.
- Toute trace du film a disparu.

25

Le groupe de rats témoins, non traité par le film de l'invention, montre des adhérences pour chacun des 10 rats, dont les

caractéristiques sont identiques aux résultats publiés dans le document HARRIS et Coll. (1995) mentionné ci-dessus.

REFERENCES

1. DI ZEREGA G.S. (1994) - « Contemporary adhesion prevention », *Fertility and Sterility*, **61** (2), 219-235.
- 5 2. HARRIS E.S. - MORGAN R.F. - RODEHEAVER G.T. (1995) - « Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents », *Surgery*, **117** (6), 663-669.
- 10 3. BECKER J.M. - DAYTON M.T. - FAZIO V.W. - BECK D.E. - STRYKER S.J. - WEXNER S.D. - WOLFF B.G. - ROBERTS P.L. - SMITH L.E. - SWEENEY S.A. - MOORE M. (1996) - « Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane : A prospective, randomized, double-blind multicenter study », *The J. of Amer. College of Surgeons*, **183** (4), 297-306.
- 15 4. KHOURY W. - ABDUL-MALAK N. - HUC A. (1994) - « Membrane collagénique anti-adhérence post-opératoire », *Demande de brevet en France N° 94 06995 du 08.06.94 (publiée sous le N° 2 720 945)*.
- 20 5. TAYOT J.L. - MARESCAUX J. - DUMAS H. - TARDY M. (1988) - « Visceral surgery patch », *Brevet US-A-5 201 745 délivré le 13 avril 1993 (sous priorité de la demande de brevet français N° 88 03321 du 15.03.88, délivrée le 13.07.90 sous le N° 2 628 634)*.
- 25

6. ORLY I. (1994) - « Use of collagen membranes as peritoneal renewing prostheses », *Demande de brevet internationale WO 96/082 77 (sous priorité de la demande de brevet français N° 94 11 015 du 15.09.94).*
- 5
7. YEUNG J.E. - CHU G.H. - DE LUSTRO F.A. - RHEE W.M. (1995) - « Anti adhesion films and compositions for medical use », *Demande de brevet européen N° 96 102 339.7 (publiée sous le N° 0 732 110) (sous priorité de la demande de brevet*
10 *américain Serial N° 403 360 du 14.03.95).*
8. TARDY M. - TIOILLIER J. - TAYOT J.L. (1994) - « Composition adhésive, à usage chirurgical, à base de collagène modifié par coupure oxydative et non réticulé » - *Demande de brevet français*
15 *N° 94 00715. du 24.01.94, délivrée le 02.08.96 sous le N° 2 715 309.*
9. TARDY M. - TAYOT J.L. (1986) - « Process for the treatment of collagen, notably for facilitating its cross-linking, and the collagen obtained by the application of the said process », *Brevet*
20 *US-A-4 931 546 délivré le 05/06/1990 (sous priorité de la demande de brevet français N° 86 10 160 du 11.07.86, délivrée le 12.05.89 sous le N° 2 601 371).*

REVENDECATIONS

1. Matériau collagénique biocompatible, non toxique, potentiellement adhésif et biodégradable en moins d'une semaine, caractérisé en ce qu'il comprend du collagène et au moins un additif
5 hydrophile macromoléculaire, chimiquement non réactif vis-à-vis du collagène, le collagène étant réticulé.

2. Matériau collagénique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend du collagène modifié par coupure oxydative et chauffage au-dessus de 37°C, réticulé en présence d'au moins un
10 additif hydrophile macromoléculaire chimiquement non réactif vis-à-vis dudit collagène.

3. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le collagène est modifié par coupure oxydative à l'aide d'acide périodique ou l'un de
15 ses sels.

4. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'additif hydrophile macromoléculaire présente un poids moléculaire supérieur à 3 000 Daltons.

20 5. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'additif hydrophile est un polymère hydrophile de poids moléculaire compris entre 3 000 et 20 000 Daltons.

25 6. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'additif hydrophile est le polyéthylèneglycol.

7. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'additif hydrophile est un polysaccharide choisi de préférence parmi l'amidon, le Dextran et la cellulose.

5 8. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend du collagène et au moins un additif hydrophile macromoléculaire selon un rapport collagène/additif(s) hydrophile(s) allant de 1/1 à 9/1, de préférence de 2/1 à 4/1 et plus préférentiellement encore de 3/1.

10 9. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il contient en outre de la glycérine.

10. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il se présente sous la
15 forme d'un film.

11. Procédé pour l'obtention d'un matériau collagénique biocompatible, non toxique, potentiellement adhérent et biodégradable en moins d'une semaine, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 20 a) la préparation d'une solution de collagène modifié par coupure oxydative ;
- b) le traitement par chauffage à une température supérieure à 37°C, de ladite solution ;
- c) le mélange de la solution collagénique résultante avec une solution contenant au moins un additif hydrophile macromoléculaire, chimiquement non réactif vis-à-vis du
25 collagène présent ;
- d) la neutralisation dudit mélange jusqu'à pH neutre.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que, dans l'étape a) on prépare une solution acide de collagène, à une concentration comprise entre 5 et 50 g/l, et on la mélange à température ambiante, avec une solution d'acide périodique ou l'un de ses sels, à une concentration comprise entre 1 et 10^{-5} M.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 et 12, caractérisé en ce que, dans l'étape b), on chauffe la solution de collagène modifié par coupure oxydative, à une température comprise entre 40 et 50° C.

10 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que dans l'étape c), l'additif hydrophile présente un poids moléculaire supérieur à 3 000 Daltons.

15 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que dans l'étape c), l'additif hydrophile est un polymère hydrophile de poids moléculaire compris entre 3 000 et 20 000 Daltons.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que dans l'étape c), l'additif hydrophile est le polyéthylène glycol.

20 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisé en ce que dans l'étape c), l'additif hydrophile est un polysaccharide choisi de préférence parmi l'amidon, le dextrane et la cellulose.

25 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, caractérisé en ce que, dans l'étape c), la concentration en additif hydrophile est de 2 à 10 fois inférieure à celle du collagène.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 18, caractérisé en ce que dans l'étape c), on ajoute en outre de la glycérine.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que la
5 concentration en glycérine est comprise entre 3 et 8 g/l.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 20, caractérisé en ce que l'on forme un film à partir de la solution contenant le collagène modifié par coupure oxydative et chauffage, au moins un additif hydrophile et éventuellement de la glycérine.

10 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'on applique en couche mince la solution, de manière sensiblement uniforme, sur un support inerte sensiblement plan, on laisse s'effectuer la réticulation du collagène puis on sépare du support le film formé.

15 23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 21 et 22, caractérisé en ce que la solution contient 2 à 6 % de collagène, 0,6 à 2 % d'additif hydrophile, 0,3 à 0,8 % de glycérine et la couche mince appliquée sur ledit support inerte présente une densité comprise entre 0,05 et 0,3 g/cm².

2759083

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 538439
FR 9701373

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A D	EP 0 664 132 A (IMEDEX) & FR 2 715 309 A ---	
A,D	WO 96 08277 A (COLETICA ;ORLY ISABELLE) ---	
A	EP 0 213 563 A (JOHNSON & JOHNSON PROD INC) -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
31 octobre 1997		Cousins-Van Steen, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 02.92 (P04C12)